

· 基础医学 ·

GDF15 激活 ERK/Bcl-2 通路增强 BM-MSCs 放射抗性

吴 春^{1,2}, 张小梅¹, 向 阳¹, 冉 茜¹, 李忠俊^{1*}, 张克斌^{2*}¹陆军军医大学第二附属医院检验医学中心(输血科)放射生物学实验室, ²临床医学研究中心, 重庆 400037

[摘要] 目的:探讨生长分化因子15(growth differentiation factor 15, GDF15)在调控人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)放射抗性中的作用及机制。方法:利用Lipofectamine 3000转染siRNA,干扰BM-MSCs的GDF15表达。9 Gy Co-60 γ 射线照射后,采用流式细胞术检测细胞周期及凋亡,CCK-8检测增殖,JC-1检测线粒体膜电位,免疫荧光、实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹分析(Western blot)检测GDF15及ERK/Bcl-2信号通路关键分子的表达。结果:放射后GDF15的表达水平显著升高。未放射条件下,干扰GDF15对细胞周期、增殖和凋亡无显著影响($P > 0.05$)。放射后,干扰GDF15导致细胞G2期阻滞增加($P < 0.05$),细胞增殖显著抑制($P < 0.01$);同时线粒体膜电位降低,Caspase3活化及细胞凋亡增加($P < 0.05$)。干扰GDF15显著抑制ERK1/2的磷酸化和Bcl-2的蛋白水平,而增加Bax的表达。结论:放射诱导GDF15上调,可提高BM-MSCs的放射抗性,其机制与ERK/Bcl-2信号通路有关。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;GDF15;放射抗性;凋亡;增殖

[中图分类号] R818

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)07-976-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20210707

GDF15 promotes irradiation resistance of bone marrow mesenchymal stem cells via the activation of ERK/Bcl-2 pathway

WU Chun^{1,2}, ZHANG Xiaomei¹, XIANG Yang¹, RAN Qian¹, LI Zhongjun^{1*}, ZHANG Kebin^{2*}¹Laboratory Medicine Center, Department of Blood Transfusion, Lab of Radiation Biology, ²Clinical Medical Research Center, the Second Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of growth differentiation factor 15 (GDF15) in irradiation resistance of human bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and determine its underlying mechanism. **Methods:** The BM-MSCs were transfected with GDF15 siRNA using Lipofectamine 3000. After the irradiation of BM-MSCs with 9 Gy Co-60 γ -rays, the cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry, CCK-8 was used to detect cell proliferation, and JC-1 was used to detect mitochondrial membrane potential, immunofluorescence, quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression of GDF15, and the key molecules in ERK/Bcl-2 signaling pathway. **Results:** After irradiation, the expression of GDF15 was increased significantly. Interference of GDF15 had no significant effect on cell cycle, proliferation and apoptosis in no-irradiated BM-MSCs ($P > 0.05$). Interference of GDF15 in BM-MSCs suffering from irradiation increased G2 phase arrest ($P < 0.05$), inhibited cell proliferation significantly ($P < 0.01$), and decreased mitochondrial membrane potential. Meanwhile, Caspase3 was activated and apoptosis was significantly increased ($P < 0.05$). The phosphorylation level of ERK1/2 and the expression level of Bcl-2 in GDF15 interference cells decreased significantly, while the expression of Bax increased significantly. **Conclusion:** The up-regulated expression of GDF15 induces upon irradiation, and enhances irradiation resistance of BM-MSCs through the activation of ERK/Bcl-2 signaling pathway.

[Key words] bone marrow mesenchymal stem cells; GDF15; irradiation resistance; apoptosis; proliferation

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(07):976-983, 991]

[基金项目] 中国博士后科学基金(2018M643861);陆军军医大学第二附属医院人才培养计划(2018YQYLY005)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhongjunli@tmmu.edu.cn; zhangkebin12@163.com

随着放射技术在军事、医药和其他行业的大量应用,急性放射综合征(acute radiation syndrome, ARS)的研究也越来越受到人们的重视。放射造成造血系统损伤,导致骨髓造血功能障碍,严重时危及生命。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)作为骨髓造血微环境的重要组成部分,其自身及其后代子细胞可为造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)提供物理支撑。此外, BM-MSCs也可通过分泌多种造血/细胞因子,对HSCs的自我更新、分化及骨髓定植均发挥重要作用^[1-3]。目前认为,相较于HSCs, BM-MSCs具有较强的放射抗性,其相关的放射抗性机制主要包括: DNA损伤的有效识别,双链断裂修复及细胞凋亡逃逸等,但目前其具体机制尚未被完全阐明^[4]。鉴于BM-MSCs的存活可为放射损伤后造血重建提供基质干细胞基础,因此,深入研究其放射抗性机制,对探索骨髓型急性放射病救治的新策略具有重大意义。

生长分化因子15(growth differentiation factor 15, GDF15)是转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)超家族中的一员,在各种细胞和组织中广泛分布,伴随着不同的应激反应,如炎症、心脏缺血再灌注、急性组织损伤、放射、癌症等, GDF15的表达会大幅增加^[5-9]。既往研究表明, GDF15在部分癌细胞中高表达,并且在癌症的不同进展阶段具有促凋亡和抗凋亡两种效应^[10-12]。本课题组前期研究结果显示, BM-MSCs放射后, GDF15的表达显著升高^[13],其是否在BM-MSCs的放射抗性中发挥关键作用,目前尚不清楚。本研究考察了放射后上调的GDF15表达在BM-MSCs放射抗性中的作用,并初步探讨了其可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人BM-MSCs、人BM-MSCs培养基(ScienCell公司,美国),人GDF15干扰片段(广州锐博生物科技有限公司),逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq II试剂盒(大连宝生物工程有限公司),Western blot转膜液、一抗稀释液、二抗稀释液、封闭液、RIPA细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶电泳配制试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒JC-1(上海碧云天生物技术有限公司),PCR引物(上海生工生物工程股份有限公司),PI staining检测试剂盒、Annexin V-PE/7AAD凋亡检测试剂盒(BD公司,美国),CCK-8(同仁化工,日本),Lipofectamine 3000

试剂(Invitrogen公司,美国), GDF15、p-ERK1/2、ERK1/2抗体(Abcam公司,美国),Caspase3、Cleaved caspase3抗体(CST公司,美国),Bcl-2、Bax、 β -actin抗体(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

BM-MSCs使用专用BM-MSCs培养基培养,原代细胞复苏于T-75细胞培养瓶中,37℃,5% CO₂的培养箱中培养,视为P1代细胞。细胞融合度达到85%~90%,1:3传代至P2代细胞。本研究使用P6~P10代细胞进行后续细胞实验。

1.2.2 细胞分组及放射处理

实验分为3组:空白对照组、干扰对照组和干扰GDF15组。采用Co-60 γ 射线对细胞进行放射处理,处理剂量为9 Gy,剂量率为0.65 Gy/min^[14]。

1.2.3 GDF15 siRNA干扰片段转染BM-MSCs

取对数生长期的细胞,接种于6孔板中,融合度在70%。按Lipofectamine 3000试剂说明书的比例配比各试剂,室温孵育15 min,加入6孔板中,24 h后收集细胞检测mRNA的表达,72 h后收集细胞检测蛋白的表达。GDF15干扰片段靶序列如下:干扰片段1:5'-CCATGGTGCTCATTCAAAA-3';干扰片段2:5'-GACTCCAGATTCCGAGAGT-3';干扰片段3:5'-CCAACTGCTGGCAGAATCT-3'。

1.2.4 蛋白免疫印迹分析(Western blot)检测蛋白表达

收集细胞,PBS洗1次,加入RIPA裂解液提取细胞总蛋白;冰上裂解30 min,10 000 g 4℃离心15 min,收上清;BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定,加入1/5体积蛋白上样缓冲液,煮沸10 min,使蛋白变性。根据目的蛋白分子量配制浓度为12%的SDS-PAGE凝胶,按照30 μ g总蛋白上样,100 V电泳,200 mA转膜;5% BSA室温封闭1 h,一抗孵育4℃过夜,抗体使用浓度:GDF15抗体(1:1 500)、p-ERK1/2、ERK1/2、Caspase3、Cleaved caspase3、Bcl-2、Bax、 β -actin抗体(1:1 000),TBST洗膜3次,二抗室温孵育2 h,洗膜3次,ECL显影曝光并拍照,实验重复3次。

1.2.5 RT-qPCR检测mRNA水平

收集细胞,每管加入1 mL TRIzol试剂提取细胞总RNA,移液枪反复吹打直至无明显沉淀,室温裂解30 min;加入上述裂解液体积1/5的氯仿,涡旋室温静置15 min,10 000 g 4℃离心15 min;取上层无色液体转移至新的无酶EP管中,向上述无色液体中

加入同等体积异丙醇,混匀室温静置10 min,10 000 *g* 4 ℃离心10 min,弃上清;加入800 μ L 75%乙醇清洗沉淀,7 500 *g* 4 ℃离心10 min,弃上清,室温干燥沉淀;加入20 μ L DEPC水,溶解RNA,测RNA浓度。按照TaKaRa的逆转录试剂盒说明书操作步骤反转录得到cDNA,进行RT-qPCR。引物序列:GDF15上游:5'-GACCCTCAGAGTTGCACTCC-3',下游:5'-GCCTGGTTAGCAGGTCCTC-3'; β -actin上游:5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3',下游:5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3',每组3个复孔,实验重复3次。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期细胞,1.5 $\times$ 10⁵个/孔接种于6孔板中,接种24 h后转染各组细胞;9 Gy放射处理,24 h后收集细胞,1 000 r/min离心5 min,冰PBS清洗3次;根据凋亡检测试剂操作说明书,按照每孔100 μ L结合液,5 μ L Annexin V-PE和5 μ L 7-AAD配制检测液,分别加入各组细胞中,重悬混匀,室温避光孵育15~30 min,流式细胞仪检测,每组3个复孔,实验重复3次。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期细胞,接种于25 cm²细胞瓶中,细胞融合度达60%转染各组细胞;9 Gy放射处理,24 h后收集细胞,1 000 r/min离心5 min,PBS清洗3次,75%冰乙醇固定,4 ℃冰箱过夜;PBS洗3次,PI染色,重悬混匀,室温避光孵育15 min,流式细胞仪检测,每组3个复孔,实验重复3次。

1.2.8 CCK-8检测细胞增殖

取对数生长期细胞,2 000个/孔接种于96孔板中,24 h后转染各组细胞,9 Gy放射处理;72 h后弃培养基,按照每孔100 μ L培养基,10 μ L CCK-8试剂配制检测液,分别加入96孔板中,37 ℃避光孵育2 h,酶标仪450 nm检测吸光度,每组5个复孔,实验重复3次。

1.2.9 免疫荧光染色

取对数生长期细胞2 $\times$ 10⁴个/孔接种于激光共聚焦皿中,24 h后转染各组细胞,9 Gy放射处理;分别收取未放射、放射后8 h和放射后24 h 3个时间点细胞;弃培养基,PBS洗1次,37 ℃ 4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS洗3次;0.2% Triton X-100破膜30 min,PBS洗3次;5% BSA封闭1 h;GDF15一抗(1:200)4 ℃孵育过夜,PBS洗3次;二抗37 ℃避光孵育3 h,PBS洗3次;DAPI染色10 min,室温避光,PBS洗3次;抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜观察拍照,实验重复3次。

1.2.10 线粒体膜电位检测

取对数生长期细胞,2 $\times$ 10⁴个/孔接种于24孔板中,24 h后转染各组细胞,9 Gy放射处理;分别收取未放射、放射后8 h细胞。阳性对照设置:阳性对照孔中加入碳酰氰基-对-氯苯腙(CCCP,使用浓度为10 μ mol/L)处理细胞20 min。吸除培养基,PBS洗1次,加入500 μ L JC-1染色工作液,细胞培养箱中孵育20 min;吸除上清,PBS洗2次,加入1 mL细胞培养液,荧光显微镜观察拍照,实验重复3次。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,实验计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。同一测量值在不同的时间比较采用重复测量的方差分析;两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析和LSD- t 检验,方差不齐数据采用Tamhane's T2检验进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放射诱导BM-MSCs中GDF15表达上调

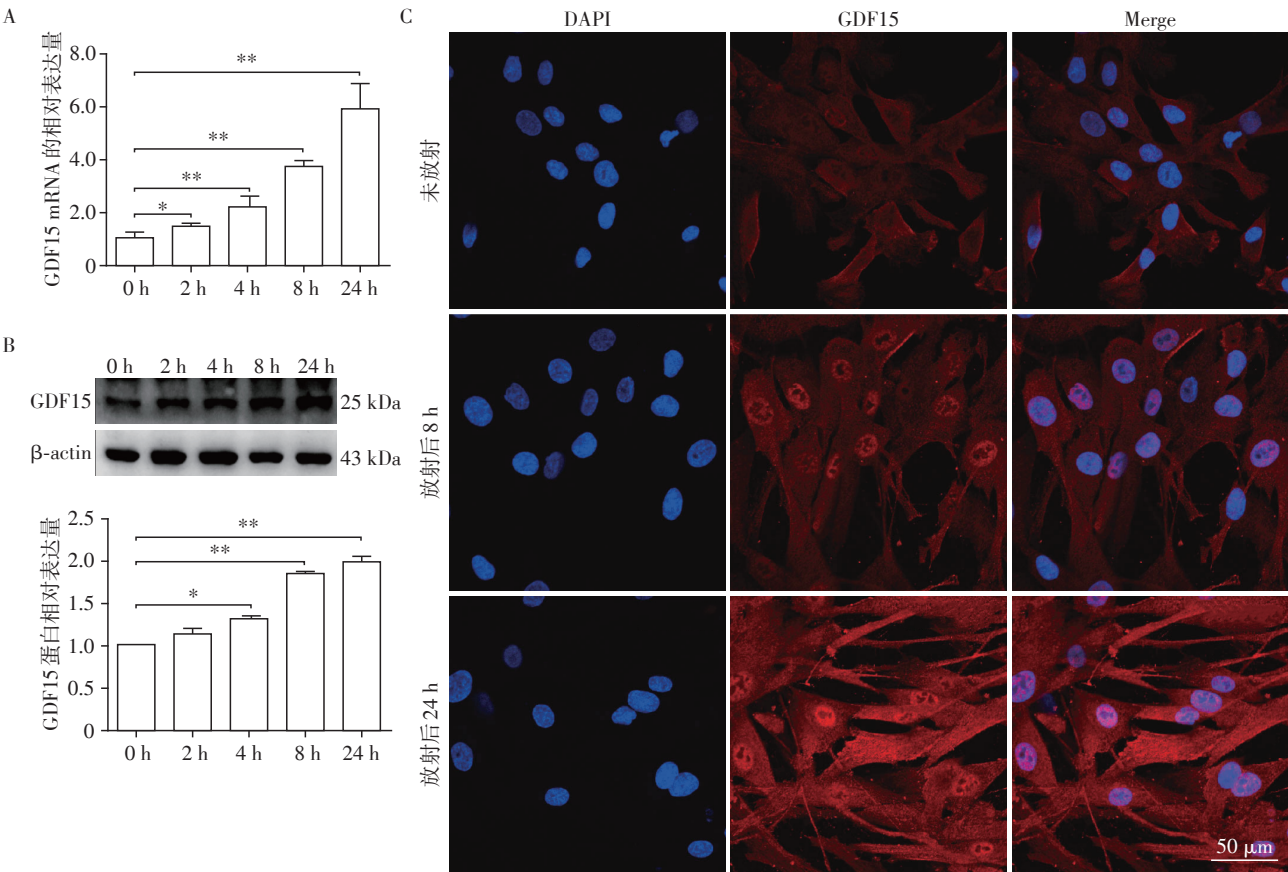
为明确放射后BM-MSCs中GDF15的表达情况,分别通过RT-qPCR、Western blot和免疫荧光检测细胞经放射处理后不同时间点GDF15的mRNA和蛋白表达水平。结果显示,GDF15的mRNA和蛋白水平在放射后显著升高(图1A、B)。同时,免疫荧光的结果也证实,放射可诱导GDF15的表达增加(图1C)。综上,在BM-MSCs细胞经放射诱导后GDF15的表达上调。

2.2 GDF15干扰效果验证

为明确放射后高表达的GDF15在BM-MSCs放射抗性中的作用,我们采用脂质体转染siRNA片段干扰GDF15的表达,并于细胞转染24 h后,进行mRNA检测。结果显示,与干扰对照组相比,3个干扰片段均能有效降低GDF15的mRNA表达水平($P < 0.05$,图2A),其中干扰片段1的mRNA抑制效率达到75%;细胞转染72 h后,进行蛋白检测,结果显示,与干扰对照组相比,3个干扰片段均能有效降低GDF15蛋白表达($P < 0.05$,图3B、C)。综合上述结果,干扰片段1的抑制效果最好,并拟采用此片段进行后续的干扰实验。

2.3 干扰GDF15的表达可降低BM-MSCs放射后细胞增殖

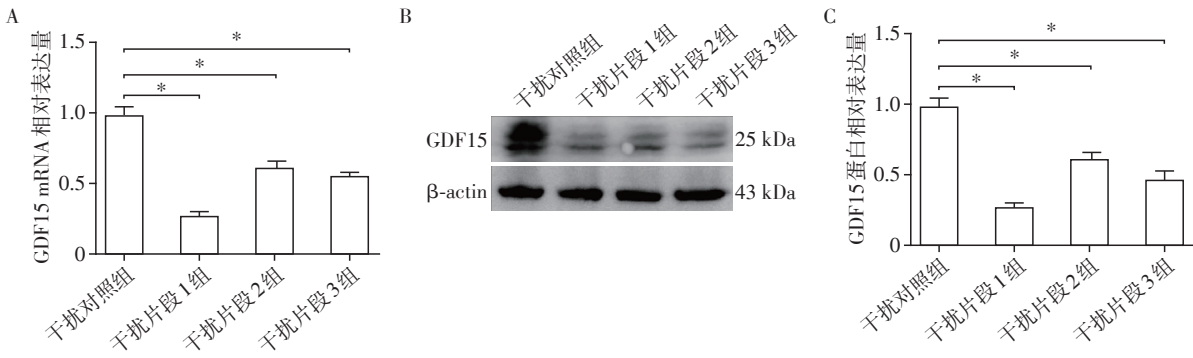
为明确GDF15表达水平对放射前后细胞增殖的影响,我们检测了细胞周期和细胞增殖活力。收取未放射和放射后24 h的BM-MSCs细胞,通过PI



A: RT-qPCR检测9 Gy放射后细胞GDF15的mRNA表达水平;B: Western blot检测9 Gy放射后细胞GDF15蛋白水平;C:免疫荧光染色检测9 Gy放射后细胞GDF15蛋白表达($\times 400$)。两组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ ($n=3$)。

图1 BM-MSCs经放射后GDF15的表达情况

Figure 1 The expression of GDF15 in BM-MSCs after irradiation



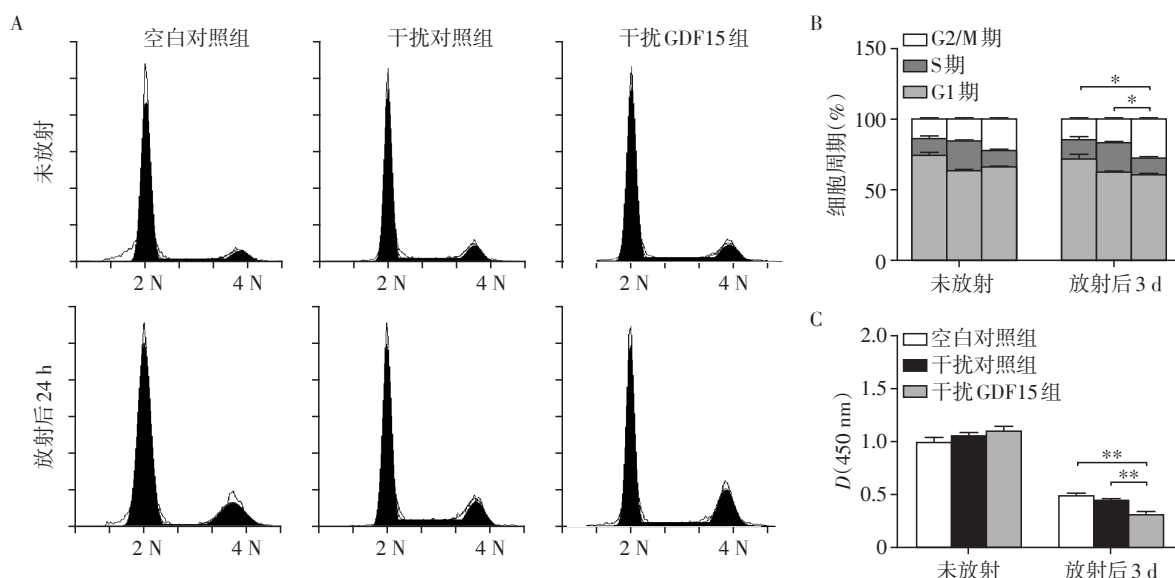
A: RT-qPCR检测细胞转染24 h后GDF15 mRNA水平;B: Western blot检测细胞转染72 h后GDF15蛋白水平;C: Western blot灰度值统计结果。两组比较, $^*P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 RT-qPCR和Western blot验证GDF15干扰效果

Figure 2 The interference effect of GDF15 in BM-MSCs were detected by RT-qPCR and Western blot

染色检测细胞周期,结果显示,未放射条件下,干扰GDF15对BM-MSCs周期无明显影响;放射后24 h时,干扰GDF15组G2期比例显著增加($P < 0.05$,图3A、B)。收取放射3 d后的细胞,CCK-8法检测细胞增殖活力,结果显示与细胞周期结果相符,干扰

GDF15几乎不影响未放射时的细胞增殖活力,却可导致放射后BM-MSCs细胞增殖活力显著降低($P < 0.01$,图3C)。综上所述,干扰GDF15基因表达可导致放射后BM-MSCs细胞G2期阻滞并且降低细胞增殖活力。



A:PI染色检测9 Gy放射后0 h、24 h细胞周期结果;B:细胞周期统计图,两组比较,* $P < 0.05$ ($n=3$);C:CCK-8检测9 Gy放射后3 d的细胞增殖结果,两组比较,** $P < 0.01$ ($n=5$)。

图3 干扰GDF15抑制BM-MSCs放射后细胞周期及增殖

Figure 3 GDF15 interference inhibited the cell cycle and proliferation of BM-MSCs after irradiation

2.4 干扰GDF15表达可增加BM-MSCs放射后细胞凋亡

为进一步明确GDF15表达对BM-MSCs放射抗性的影响,我们通过Annexin V-PE/7AAD染色及检测Cleaved caspase3和JC-1变化水平,明确干扰GDF15表达对BM-MSCs放射后细胞凋亡的影响。检测结果如图4A、B所示,未放射条件下,干扰GDF15表达对细胞的凋亡无显著性影响。而放射后,干扰GDF15可导致细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$)。与之相应,Cleaved caspase3的Western blot结果证实,干扰GDF15可使放射后Caspase3的剪切水平增加(图4C)。同时,检测JC-1细胞线粒体膜电位的变化情况发现,在未放射条件下,对照组与干扰GDF15红/绿荧光强度比值无统计差异($P > 0.05$)。而放射后,干扰GDF15组与其干扰对照组相比,红/绿荧光强度比值显著降低,提示线粒体膜电位下降($P < 0.001$,图5)。上述结果表明,干扰GDF15表达可显著增加BM-MSCs细胞放射后凋亡。

2.5 干扰GDF15表达可抑制BM-MSCs的ERK/Bcl-2信号通路活化

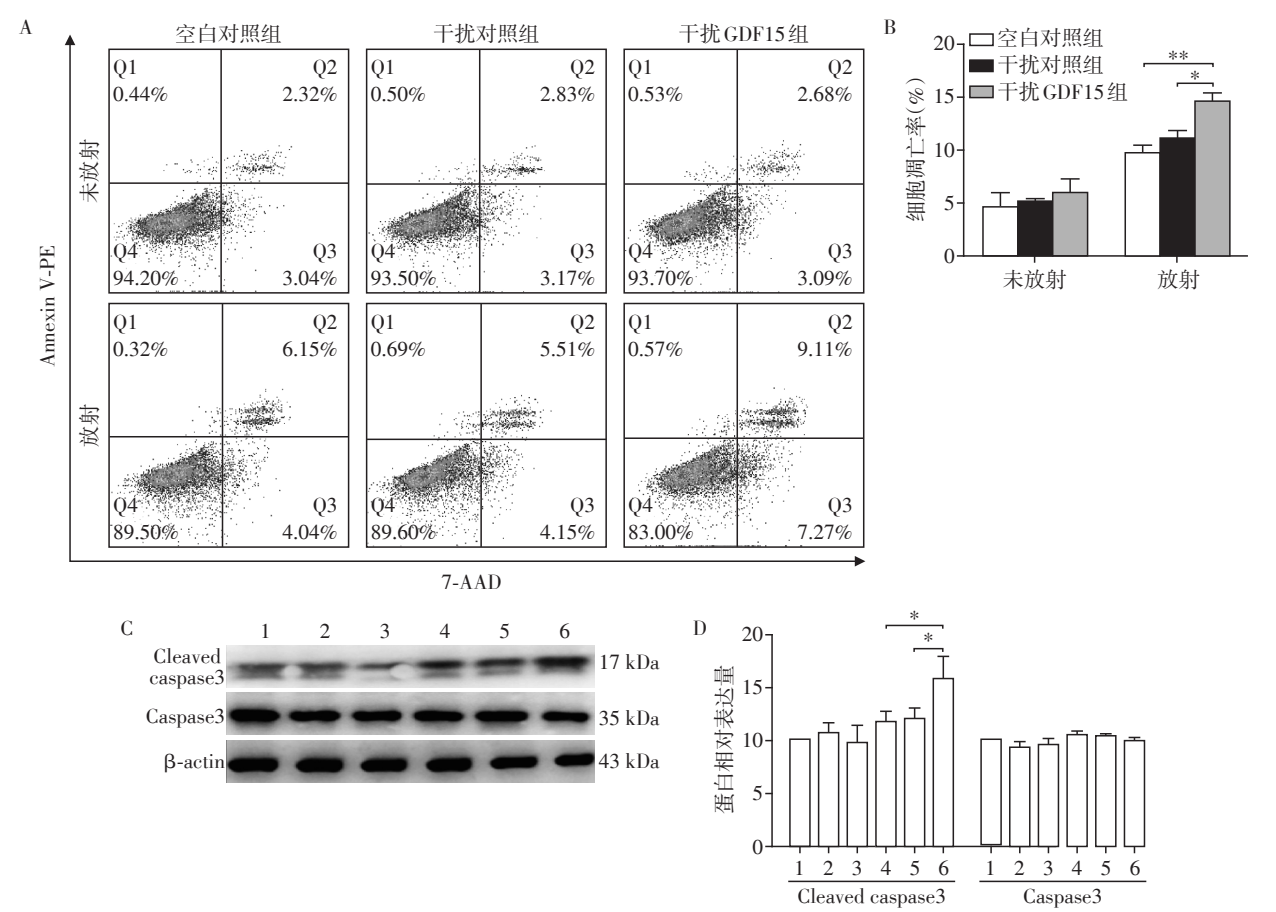
为进一步明确干扰GDF15表达增加BM-MSCs放射敏感性的分子机制,我们检测了GDF15下游与细胞凋亡密切相关的关键通路ERK/Bcl-2的活化情况^[15]。Western blot检测结果表明:与空白对照组和干扰对照组相比,干扰GDF15后,ERK1/2磷酸化水

平明显降低,表明GDF15可以通过增加ERK1/2的磷酸化调节其下游蛋白的表达。与对照组相比,干扰GDF15导致抗凋亡关键分子Bcl-2蛋白水平明显降低,而促凋亡分子Bax蛋白水平明显升高(图6)。综上所述,干扰GDF15表达可通过抑制ERK信号通路活化,调节下游Bcl-2和Bax蛋白表达,进而增加BM-MSCs放射后凋亡。

3 讨论

在ARS的研究中,骨髓造血损伤是各种放射病最基本和最致命的表现之一,并贯穿各型ARS的始终^[16]。因此,对于骨髓造血功能损伤的防治是ARS防治的关键和重要研究领域。BM-MSCs是一类具有自我更新和多向分化潜能的干细胞,可以分化为包括成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、内皮细胞和成纤维细胞在内的骨髓基质细胞,以形成HSCs骨髓内定植的龛位,也可分泌多种造血因子、细胞因子和趋化因子建立细胞因子网络,对于正常造血功能的维持和损伤后造血重建都至关重要^[17]。因此研究BM-MSCs的放射抗性,对于造血重建具有重大意义。

凋亡是放射诱导细胞死亡的主要原因之一,而BM-MSCs对凋亡的抗性被认为是放射耐受的关键机制。已有研究表明,放射后BM-MSCs的抗凋亡作用与较强的DNA损伤修复能力和较快的活性氧清除有关^[18]。我们前期研究发现,GDF15升幅高的



A: Annexin V-PE 和 7-AAD 双染检测 9 Gy 放射后 24 h 细胞凋亡流式图; B: 细胞凋亡统计图; C: Western blot 检测 9 Gy 放射后 24 h 细胞 Cleaved caspase3 及其总蛋白表达; D: Western blot 结果灰度值统计。1: 未放射空白对照组, 2: 未放射干扰对照组, 3: 未放射干扰 GDF15 组, 4: 放射空白对照组, 5: 放射干扰对照组, 6: 放射干扰 GDF15 组。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图4 干扰GDF15对BM-MSCs放射前后细胞凋亡的影响

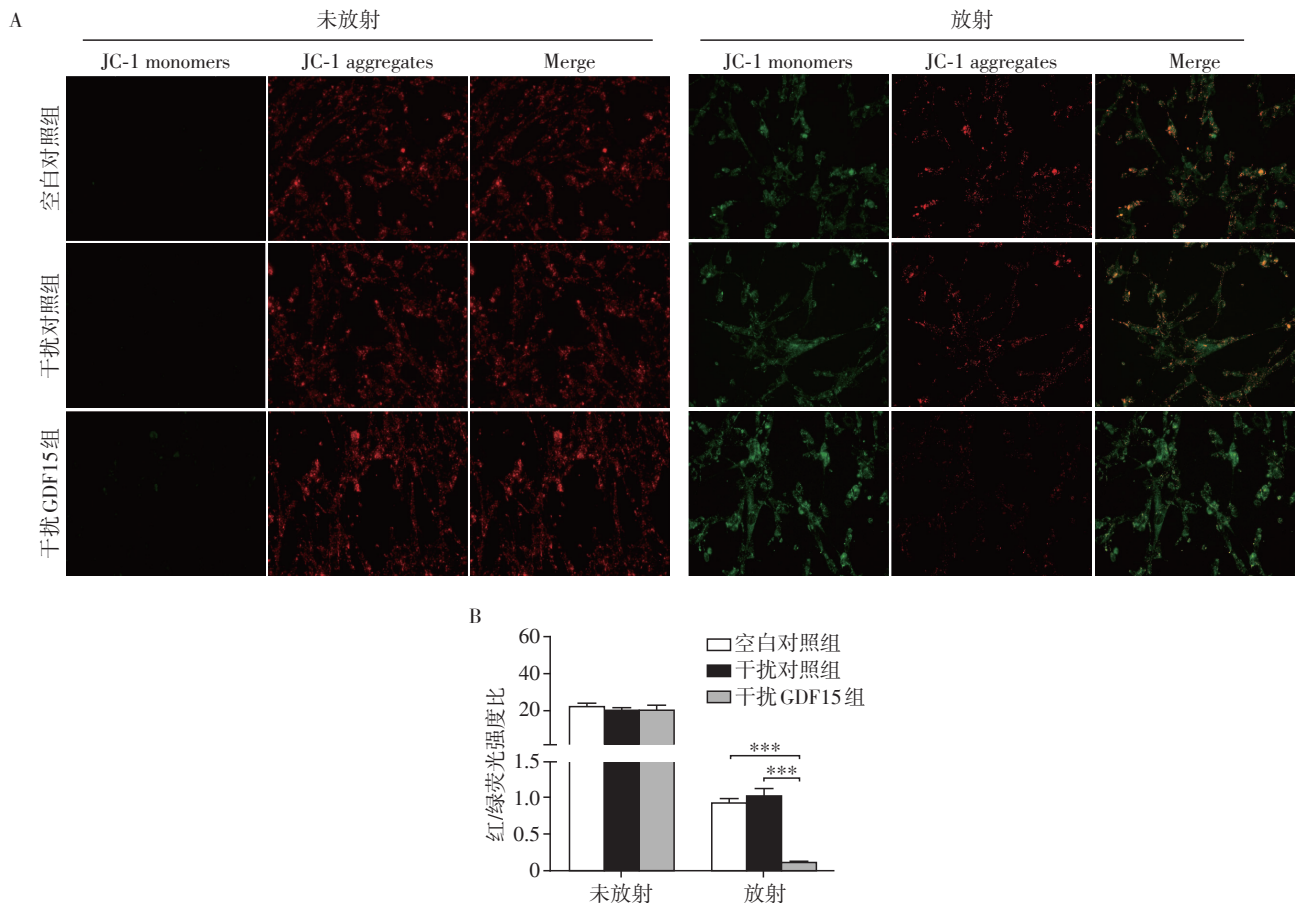
Figure 4 The effects of GDF15 interference on the apoptosis of BM-MSCs before and after irradiation

BM-MSCs 凋亡率较低^[13],提示GDF15可能参与BM-MSCs的放射抗性,但具体机制未明。本研究发现放射可诱导BM-MSCs中GDF15表达显著上调,而干扰其表达可导致放射后细胞凋亡率增加,证实GDF15可促进细胞的放射抵抗。细胞对放射的敏感性与所处的周期密切相关,处于G1/S期的细胞放射敏感性低,处于G2期的细胞放射敏感性高^[19]。已有文献报道,GDF15参与细胞周期的调控。如在宫颈癌细胞中,GDF15诱导c-Myc的表达,c-Myc作为调节细胞周期的经典转录因子,可诱导CDK1和cyclinB1的上调,CDK1-cyclinB1形成复合物促进细胞通过G2期^[7, 20]。本研究也证实干扰GDF15,放射后BM-MSCs的G2期阻滞增加。但是否GDF15通过该机制参与放射后BM-MSCs的G2期调控有待进一步研究。

线粒体是放射损伤的重要靶点。放射可直接作用于线粒体DNA,也可间接通过辐解产生的活性氧损伤线粒体的蛋白及细胞膜系统,破坏电子传递

链(ETC)复合物I、II等,从而导致线粒体膜通透性改变、融合-分裂动态平衡失衡、线粒体膜电位下降等一系列结构和功能损害^[21]。此外,GDF15也是线粒体功能损伤的标志物^[22]。因此,我们检测了干扰GDF15对放射前后线粒体膜电位以及Caspase3剪切情况的影响。正常的线粒体膜电位是维持线粒体功能的关键,而其膜电位的降低是细胞凋亡早期的一个标志性事件^[23]。本研究结果显示干扰GDF15对正常BM-MSCs线粒体膜电位无显著影响,但放射后却可以显著降低线粒体膜电位。此外,干扰GDF15的BM-MSCs放射后Cleaved caspase3水平最高。综上所述,干扰GDF15诱导BM-MSCs放射敏感性增加可能与线粒体凋亡途径增强有关。

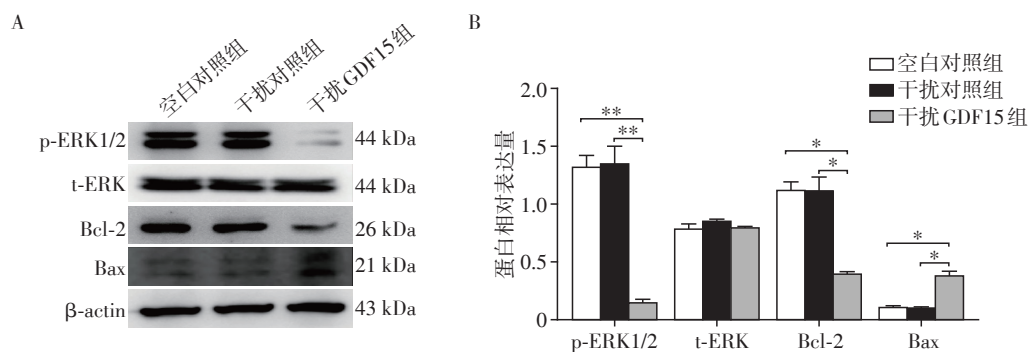
ERK信号通路在BM-MSCs的增殖、分化和凋亡中具有重要作用。抑制ERK1/2磷酸化可通过调控Bax和Bcl-2表达水平,激活Caspase3,导致细胞凋亡^[24]。在多种肿瘤细胞中,已有研究证实GDF15



A:JC-1检测9 Gy放射后8 h细胞线粒体膜电位荧光图($\times 200$);B:荧光强度统计图,两组比较, $***P < 0.001(n=3)$ 。

图5 干扰GDF15后BM-MSCs放射前后线粒体膜电位变化

Figure 5 The effect of GDF15 interference on mitochondrial membrane potential of BM-MSCs before and after irradiation



A:Western blot检测BM-MSCs细胞p-ERK1/2、t-ERK、Bcl-2和Bax蛋白表达;B:Western blot灰度值统计结果,两组比较, $*P < 0.05(n=3)$ 。

图6 干扰GDF15后BM-MSCs放射后ERK及其下游蛋白的表达

Figure 6 The effect of GDF15 interference on ERK and its downstream proteins of BM-MSCs after irradiation

可结合酪氨酸激酶受体 ErbB2,激活 ErbB2 的激酶活性,进而磷酸化 ERK1/2 调控细胞增殖^[7, 25]。因此,我们检测了在 BM-MSCs 中 GDF15 对 ERK1/2 磷酸化的影响,结果显示干扰 GDF15 抑制了 ERK1/2 的磷酸化水平。ERK1/2 对细胞凋亡的调控主要通过 Bcl-2 和 Bax 蛋白调节实现。研究表明,ERK1/2

依赖性磷酸化可以激活 cAMP 反应性元素结合蛋白 (CREB),磷酸化的 CREB 入核并与 Bcl-2 的启动子结合,从而促进 Bcl-2 转录^[24]。当 Bcl-2 表达较 Bax 多时,两者可以结合形成异源二聚体,抑制细胞的凋亡,而 Bcl-2 表达较 Bax 少时,Bax 自身会形成同源二聚体,促进细胞的凋亡^[27]。既往研究表明,与放

射敏感性细胞相比, MSCs高表达抗凋亡蛋白Bcl-2, 低表达促凋亡蛋白Bax^[1]。因此, 本研究检测了干扰GDF15之后, Bcl-2和Bax在BM-MSCs中的表达。干扰GDF15后Bcl-2蛋白水平降低, Bax蛋白水平升高, 表明GDF15对BM-MSCs放射抗性的调控可能通过ERK/Bcl-2通路实现。

综上所述, 本研究证明了GDF15作为放射应激分子, 通过激活ERK/Bcl-2通路活性, 参与BM-MSCs的放射抗性调控, 为放射后造血微环境的重建提供了调控靶分子。然而, BM-MSCs细胞中GDF15影响ERK磷酸化的具体机制尚不清楚, 有待进一步的研究探索。

[参考文献]

- [1] SUGRUE T, BROWN J A, LOWNDES N F, et al. Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(1): 137-145
- [2] MENDEZ-FERRER S, MICHURINA T V, FERRARO F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466(738): 829-834
- [3] FRENETTE P S, PINHO S, LUCAS D, et al. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 285-316
- [4] NICOLAY N H, LOPEZ PEREZ R, SAFFRICH R, et al. Radio-resistant mesenchymal stem cells: mechanisms of resistance and potential implications for the clinic [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19366-19380
- [5] CONTE M, MARTUCCI M, MOSCONI G, et al. GDF15 plasma level is inversely associated with level of physical activity and correlates with markers of inflammation and muscle weakness [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 915
- [6] ZHANG Y, MOSZCZYNSKI L A, LIU Q, et al. Over-expression of growth differentiation factor 15 (GDF15) preventing cold ischemia reperfusion (I/R) injury in heart transplantation through Foxo3a signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 36531-36544
- [7] LI S, MA Y M, ZHENG P S, et al. GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 80
- [8] BARONI M, MARIE S, FEDATTO P F, et al. Distinct response to GDF15 knockdown in pediatric and adult glioblastoma cell lines [J]. *J Neurooncol*, 2018, 139(1): 51-60
- [9] LUAN H H, WANG A, HILLIARD B K, et al. GDF15 is an inflammation-induced central mediator of tissue tolerance [J]. *Cell*, 2019, 178(5): 1231-1244
- [10] ELING T E, BAEK S J, SHIM M, et al. NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39(6): 649-655
- [11] ZIMMERS T A, GUTIERREZ J C, KONIARIS L G. Loss of GDF-15 abolishes sulindac chemoprevention in the ApcMin/+ mouse model of intestinal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(4): 571-576
- [12] HUSAINI Y, QIU M R, LOCKWOOD G P, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) slows cancer development but increases metastases in TRAMP prostate cancer prone mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43833
- [13] XIANG Y, WU C, WU J, et al. *In vitro* expansion affects the response of human bone marrow stromal cells to irradiation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 82
- [14] JIANG Z, JIA J, YUE C, et al. Haploidentical hematopoietic SCT using helical tomotherapy for total-body irradiation and targeted dose boost in patients with high-risk/refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2018, 53(4): 438-448
- [15] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(3): 175-193
- [16] LI C, LU L, ZHANG J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates hematopoietic stem cell injury after irradiation [J]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 65
- [17] CHEW E, PRAKASH R, KHAN W. Mesenchymal stem cells in human meniscal regeneration: a systematic review [J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2017, 24: 3-7
- [18] CHEN L, RAN Q, XIANG Y, et al. Co-activation of PKC- δ by CRIF1 modulates oxidative stress in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells after irradiation by phosphorylating NRF2 Ser40 [J]. *Theranostics*, 2017, 7(10): 2634-2648
- [19] PAWLIK T M, KEYOMARSI K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 59(4): 928-942
- [20] YANG Y, XUE K, LI Z, et al. c-Myc regulates the CDK1/cyclin B1 dependent G2/M cell cycle progression by histone H4 acetylation in Raji cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(6): 3366-3378
- [21] AZIMZADEH O, SCHERTHAN H, SARIOGLU H, et al. Rapid proteomic remodeling of cardiac tissue caused by total body ionizing radiation [J]. *Proteomics*, 2011, 11(16): 3299-3311
- [22] FUJITA Y, ITO M, KOJIMA T, et al. GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mi-

(下转第991页)

responsiveness in a murine model of airway sensitization [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4):1719-1729

[34] MURPHY M P. How mitochondria produce reactive oxygen species[J]. *Biochem J*, 2009, 417(1):1-13

[35] OBERKAMPF M, GUILLEREY C, MOURIÈS J, et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the induction of CD8(+)T cells by plasmacytoid dendritic cells[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2241

[36] MIYAHARA N, SWANSON B J, TAKEDA K, et al. Effector CD8⁺ T cells mediate inflammation and airway hyper-responsiveness[J]. *Nat Med*, 2004, 10(8):865-869

[37] PUNNONEN J, AVERSA G, COCKS B G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(8):3730-3734

[38] HORIE S, OKUBO Y, HOSSAIN M, et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis [J]. *Intern Med*, 1997, 36(3):179-185

[39] RAMIREZ-ICAZA G, MOHAMMED K A, NASREEN N, et al. Th2 cytokines IL-4 and IL-13 downregulate paxillin expression in bronchial airway epithelial cells [J]. *J Clin Immunol*, 2004, 24(4):426-434

[40] KONDO M, TAMAOKI J, TAKEYAMA K, et al. Elimination of IL-13 reverses established goblet cell metaplasia into ciliated epithelia in airway epithelial cell culture [J]. *Allergol Int*, 2006, 55(3):329-336

[41] REGAL J, LAWRENCE B, JOHNSON A, et al. Neonatal oxygen exposure alters airway hyper-responsiveness but not the response to allergen challenge in adult mice [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2014, 25(2):180-186

[收稿日期] 2021-02-08

(上接第983页)

mitochondrial diseases[J]. *Mitochondrion*, 2015, 20:34-42

[23] HUSSAIN S. Measurement of nanoparticle-induced mitochondrial membrane potential alterations [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1894:123-131

[24] WILSON B E, MOCHON E, BOXER L M. Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(10):5546-5556

[25] KIM K K, LEE J J, YANG Y, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(4):704-712

[26] PARK Y J, LEE H, LEE J H. Macrophage inhibitory cytokine-1 transactivates ErbB family receptors via the activation of Src in SK-BR-3 human breast cancer cells [J]. *BMB Rep*, 2010, 43(2):91-96

[27] HE X, SUN J, HUANG X. Expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 in hippocampus of rats with diabetes and subarachnoid hemorrhage [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1):873-877

[收稿日期] 2020-08-19